四川大学学报(医学版)
J Sichuan Univ (Med Sci Edi) 2017, 48(4):515 - 519

HSP70 在不同应激程度 CUMS 昆明小鼠胚胎中的表达及作用*

李小红,罗 珊,樊 伟,曾 珣,白 瑜,秦 朗,李尚为△

四川大学华西第二医院 生殖医学中心 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 建立雌性昆明小鼠慢性轻度不可预见性应激(CUMS)动物模型,探讨在心理应激状态下,热休克蛋白 70(HSP70)是否参与机体对胚胎的应激保护作用。**方法** 将 300 只雌性昆明小鼠以 9 种应激因子在 28 d内随机应用造模,并分为轻度、中度和重度应激 3 组。对照组(50 只)不造模。通过孕马血清促性腺激素/人绒毛膜促性腺激素促排卵,观察卵巢反应及胚胎发育潜能;采用免疫荧光染色及实时荧光定量 PCR 检测 HSP70 在 2-细胞胚胎及孕 4 d(D4)胚胎中的表达。**结果** 28 d CUMS 刺激后,实验组小鼠轻度应激占 50%(150 只),中度应激占 32%(96 只),重度应激占 18%(54 只)。促排卵后,轻度应激组小鼠 2-细胞胚胎数、D4 胚胎数和优胚率等与对照组比较差异均无统计学意义,而中、重度应激组小鼠较对照降低($P<0.05$)。免疫荧光染色和实时荧光定量 PCR 显示 HSP70 在轻、中度应激组小鼠 2-细胞胚胎和 D4 胚胎中的表达高于对照组($P<0.05$),而重度应激组较对照组差异无统计学意义。**结论** CUMS 刺激后 HSP70 的表达升高,可能与其应激保护作用有关。

【关键词】 热休克蛋白 70 慢性轻度不可预见性应激 小鼠胚胎 免疫荧光染色

Expression of HSP70 in Kunming Mouse Embryos Stimulated by Chronic Mild Anticipatory Stress

LI Xiao-hong, LUO Shan, FAN Wei, ZENG Xun, BAI Yu, QIN Lang, LI Shang-wei△. *Reproductive Medicine Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education (Sichuan University)*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lishangweilxh_001@163.com

【Abstract】 Objective To measure the expression of heat shock protein 70 (HSP70) in mice embryos with the stimulation of chronic mild anticipatory stress (CUMS) to female Kunming mice. **Methods** Three hundreds female Kunming mice were stressed by 9 chronic mild unpredictable stress factors for 28 days and then divided into three groups of mild, moderate and severe stress. PMSG/hCG was measured to assess the induction of superovulation, and ovarian response and embryo development potential were observed. The expression of HSP70 in 2-cell embryos and day 4 embryos was detected by immunofluorescence and real time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After 28 d CUMS stimulation, the rate of mice in mild, moderate and severe stress were 50%, 32% and 18%, respectively. In the mild stress group, ovarian response and oocyte development potential were similar to those of control, while HSP70 expression of the embryos was significantly higher ($P<0.05$). In the severe stress group, ovarian response and oocyte development potential were significantly decreased compared with the control group ($P<0.05$), while HSP70 expression was similar to that of control. **Conclusion** HSP70 overexpression observed in the embryos may be related to its proteetive effect against chronic unpredictable stress.

【Key words】 Heat shock protein 70 Chronic unpredictable mild stress Mouse embryos Immunofluorescence

不孕症患者在就诊及治疗过程中存在不同形式不同程度的心理应激状态[1-3]。学者们在探讨应激对生殖功能的影响机制过程中常选择动物模型,其中慢性轻度不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress,CUMS)动物模型应用较多。CUMS 动物模型是运用情绪应激的方法,使动物出现抑郁状态、兴趣丧失、快感缺乏等表现,与人体抑郁症的临床表现类似[4-5]。本课题组前期研究提示,该情绪应激模型动物生殖功能减退[6],但是否存在保护机制尚不清楚。

热休克蛋白 70(heat shock protein70,HSP70)是一种应激保护蛋白,它既能发挥分子伴侣的作用,也能通过抗细胞凋亡、抗氧化应激、调节免疫应答等方式达到对细胞应激反应的保护作用[7]。HSP70 存在于女性生殖系统包括卵巢、子宫内膜、蜕膜、胎

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2016SZ0055)资助

△ 通信作者,E-mail: lishangweilxh_001@163.com

盘和羊水等,可能参与卵子发生和胚胎发育[8]。文献报道在一定程度热应激和高氧应激状态下,动物胚胎 HSP70 表达升高[9-10],可能与 HSP70 的应激保护作用相关。而在心理应激状态下,小鼠胚胎 HSP70 的表达是否也会升高,目前尚无相关报道。

本研究对昆明小鼠进行为期 28 d 的 CUMS 刺激,观察小鼠所产生的心理反应程度,探讨 HSP70 在不同应激程度小鼠胚胎中的表达及作用。

1 对象与方法

1.1 实验动物

昆明纯种小鼠,购于四川大学实验动物中心〔动物合格证号:SCXK(川)2013-026〕。其中雌性小鼠 350 只,4～5 周龄,体质量 18～22 g,每笼饲养 5 只;雄性小鼠 20 只,5～6 周龄,体质量 22～25 g,每笼 1 只单独饲养,合笼备用。正常饲养条件:自由摄食、饮水,12 h 光照,环境温度 18～22 ℃,相对湿度 40%～60%。雌性小鼠正常饲养 5 d 后采用随机数字表法将其分为对照组(50 只)和实验组(300 只)。

1.2 实验方法

1.2.1 *CUMS 造模方法* 对照组小鼠正常饲养,实验组小鼠进行 CUMS 造模。实验组小鼠采用本课题组前期研究的方法[6]进行 CUMS 刺激,以 9 种应激因子在 28 d 内随机应用,每日一种,每种累计 2～4 次,使动物不能预料刺激的发生。9 种应激因子如下:①潮湿垫料和倾斜饲养 24 h(将 200 mL 水加入有垫料的笼底,并将小鼠笼子倾斜 45°);②禁食 24 h;③禁水 24 h;④高温 10 min(40 ℃环境);⑤夹尾 1 min(距尾根 1 cm 夹铁质小书夹);⑥4 ℃冰水游泳 5 min;⑦束缚应激 4 h;⑧陌生异常物品(如塑料杯、木勺、碎布片等);⑨孤养 24 h。

1.2.2 *CUMS 造模观察指标* ①旷场实验。在造模第 28 天,用旷场实验观察各组小鼠行为的变化。观察时将单只小鼠置于长宽各 60 cm、高 40 cm 光洁敞箱中央,敞箱底面划分为 25 个等边方格,内面用黑漆涂满。记录小鼠 5 min 内的动作行为表现,包括在中央格停留时间、跨格次数、竖立次数、理毛次数及粪便粒数。②糖水消耗实验。在造模前 1 d 及造模第 28 天进行糖水消耗实验,在进行糖水消耗实验时,实验组小鼠均单笼饲养,每只小鼠加 2%蔗糖溶液 30 mL,同时禁食,计算小鼠 4 h 内饮用 2%蔗糖溶液的量。

1.2.3 *CUMS 程度分级* 按照本课题组前期研究的方法[11],根据旷场实验中的中央格停留时间、跨格次数和竖立次数将 CUMS 小鼠分为轻度、中度和重度应激 3 组。轻度:中央格停留时间 6～8 s,跨格次数 90～105 格,竖立次数 14～16 次;中度:中央格停留时间 9～11 s,跨格次数 75～89 格,竖立次数 11～13 次;重度:中央格停留时间 12～14 s,跨格次数 60～74 格,竖立次数 8～10 次。3 项指标中有一项达到重度标准即归为重度应激组,以此类推。

1.2.4 *超排卵方案* 实验组及对照组性成熟雌性小鼠于下午 4 点腹腔内注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin,PMSG,天津实验动物中心)10 U,48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG,上海生物化学制药厂)10 U。

1.2.5 *卵母细胞的获取* 取对照组及轻、中、重度应激组性成熟小鼠各 10 只进行 PMSG/HCG 促排卵,HCG 注射后 12～14 h 采用脱臼法处死小鼠,于卵巢与子宫之间找到并取出双侧输卵管,置于预热至 37 ℃的 M2 培养基中,在解剖显微镜下以 1 号注射器针尖纵行拨开输卵管,以 M2 培养基冲洗,寻找卵母细胞(卵冠丘复合物)并计数。

1.2.6 *2-细胞胚胎的获取* 取对照组及轻、中、重度应激组性成熟小鼠各 20 只进行 PMSG/HCG 促排卵,HCG 注射后即与性成熟雄鼠 2∶1 合笼,次日 8 点观察阴栓并与雄鼠分开,见阴栓当日为孕 1 d。孕 2 d 下午 2 点(相当于见阴栓后 30 h 或 HCG 注射后 46 h)采用脱臼法处死雌性小鼠,于卵巢与子宫之间找到并取出双侧输卵管,置于预热至 37 ℃的 M2 培养基中,在解剖显微镜下以 1 号注射器针尖纵行拨开输卵管,以 M2 培养基冲洗,寻找 2-细胞期胚胎并计数。用体积分数为 4%的多聚甲醛固定以备免疫荧光检测或直接冻存于－70 ℃以备实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.7 *孕 4 d(D4)胚胎(囊胚、桑葚胚)的获取* 取对照组及轻、中、重度应激组受孕小鼠各 20 只于孕 4 d 下午 2 点采用脱臼法处死,分离并切断双侧子宫,放入预热至 37 ℃的厄尔(Earle's)平衡盐溶液中。在解剖显微镜下,用 1 mL 注射器以 Earle's 平衡盐溶液冲洗宫腔,37 ℃孵箱内静置 30 min 后在体视显微镜下寻找胚胎并计数。用体积分数为 4%多聚甲醛固定以备免疫荧光检测或直接冻于－70 ℃以备实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.8 *小鼠胚胎的评分标准* 小鼠胚胎的评分参照人类胚胎的评分标准[12],共分为六级胚胎,其中一级、二级和三级胚胎定为优质胚胎。一级胚胎评

分标准为卵裂球均匀规则，折光度适中，透明带完整，无碎片或碎片体积小于胚胎体积的 10%；二级胚胎为卵裂球不均匀欠规则，折光度稍差，碎片体积小于胚胎体积的 10%；三级胚胎为碎片体积小于胚胎体积的 50%，剩余卵裂球形态和折光度与二级胚胎相当，透明带完整。

1.2.9　胚胎免疫荧光染色　将获得的 2-细胞胚胎和 D4 胚胎进行免疫荧光染色，每组各 30 个 2-细胞胚胎和 30 个 D4 胚胎。基本步骤：①体积分数为 4%的多聚甲醛室温固定 15 min，PBS 洗 3 次；②含 0.1%Triton 的 PBS 室温打孔 10 min，PBS 洗 3 次；③含 3%BSA 的 PBS 封闭 30 min，37 ℃；④1∶100 稀释的 HSP70 一抗（Abcam 公司），4 ℃过夜，PBS 洗 3 次；⑤1∶100 稀释的羊抗鼠荧光二抗（中杉金桥生物科技公司），37 ℃，30 min，PBS 洗 3 次；⑥0.5 μg/mL Hoechst33258 染核 30 min，PBS 洗 3 次；⑦甘油封片，在共聚焦显微镜下观察并拍照。

该实验每次均设有阴性对照组，即封闭液代替一抗孵育过夜。阳性界定为激光共聚焦显微镜下见明亮的红色荧光、各细胞期胚胎的细胞轮廓能够清晰地呈现；阴性则看不到明亮的红色荧光。

1.2.10　实时荧光定量 PCR　*HSP*70 引物由 Primer Primier 5.0 引物设计软件设计，并由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。*HSP*70 正向引物序列 5′-GAGGAGTTCAAGAGGAAG-3′，反向引物系列 5′-TGATGGATGTGTAGAAGTC-3′。内参基因 β-actin，正向引物序列 5′-CACTGTGCCCATCTACGA-3′，反向引物系列 5′-ATGTCACGCACGATTTCC-3′。提取物为 50 个 2-细胞胚胎和 30 个 D4 胚胎。反应体系：正向引物 1 μL，反向引物 1 μL，Fast Start Universal SYBR Green Master 10 μL，模板（cDNA）5 μL，H_2O 3 μL。实时荧光定量 PCR 在 ABI 7900（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）上运行，其程序如下：95 ℃预变性 10 min；随后 45 个循环扩增，条件依次为 95 ℃ 15 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s；最后进行熔解曲线的数据采集，条件依次为 95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，随后按照 2%的递增速度进行缓慢升温，升温时间为 30 min，温度从 60 ℃升至 95 ℃。记录对照组和实验组 Ct 值，按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行量化分析，以对照组为 1，得出实验组的相对值。

1.3　统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验；计数资料采用百分比表示，多组间比较采用 χ^2 检验，组间两两比较采用 χ^2 分割法。相关性分析采用直线相关性分析法。$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　CUMS 刺激 28 d 后小鼠应激情况及程度分级

CUMS 刺激 28 d 后，实验组小鼠在旷场实验中的中央格停留时间和粪便粒数较对照组增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；实验组小鼠跨格次数和竖立次数较对照组减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）；两组小鼠的理毛次数差异无统计学意义。实验组小鼠 4 h 内饮用 2%糖水的量较对照组减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　CUMS 刺激 28 d 后小鼠旷场实验及糖水消耗实验

Table 1　Open field test and sucrose consumption test results after 28 days of chronic unpredictable mild stress (CUMS)

	Control group (n=50)	Stressed group (n=300)	P
Time spent in center/s	4±2	11±4	<0.05
Distance moved (counts of cross lattices)	172±39	80±22	<0.05
Rearing count/times	41±8	12±5	<0.05
Grooming count/times	3±1	4±1	>0.05
Defecation (counts of fecal boli)	2±1	4±2	<0.05
Sucrose consumption/(g/4 h)	4±2	2±1	<0.05

根据中央格停留时间、跨格次数及竖立次数将实验小鼠分为轻度、中度及重度应激 3 组。在 300 只实验小鼠中，轻度应激 150 只（50%），中度应激 96 只（32%），重度应激 54 只（18%）。

2.2　不同应激程度小鼠的促排卵情况

CUMS 刺激 28 d 后，轻度、中度、重度应激组和对照组小鼠促排卵情况见表 2。结果显示，4 组小鼠的获卵数、受精率、2-细胞胚胎数、D4 胚胎数、优胚数、优胚率和囊胚数差异均有统计学意义（$P<0.05$）。上述指标在轻度应激组和对照组之间差异无统计学意义，而中、重度应激组较对照组降低（$P<0.05$），且重度应激组较中度应激组降低（$P<0.05$）。

2.3　HSP70 在不同应激程度小鼠 2-细胞胚胎及 D4 胚胎中的表达

免疫荧光染色结果显示，HSP70 在实验组小鼠 2-细胞胚胎及 D4 胚胎中主要呈阳性表达，表达部位在包膜或透明带（附图）。统计学分析显示，HSP70 在轻度、中度、重度应激组和对照组 4 组的 2-细胞胚胎和 D4 胚胎的阳性表达率差异有统计学意义（$P<0.05$）。HSP70 在轻、中度应激组的表达较对照组

升高($P<0.05$),且轻度应激组较中度应激组升高($P<0.05$),而在重度应激组和对照组之间差异无统计学意义。见表 3。

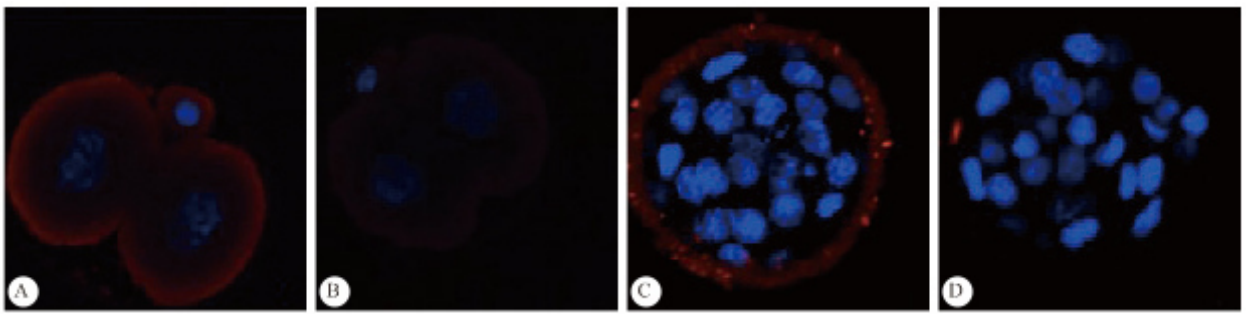
RT-PCR 结果显示,*HSP*70 mRNA 在轻度、中度、重度应激组和对照组 4 组的 2-细胞胚胎和 D4 胚胎中的表达差异有统计学意义($P<0.05$)。*HSP*70 mRNA 在轻、中度应激组的表达较对照组升高($P<0.05$),且轻度应激组较中度应激组升高($P<0.05$),而在重度应激组和对照组之间差异无统计学意义。见表 3。

表 2 CUMS 刺激 28 d 后小鼠促排卵情况

Table 2 Development potential of oocytes and embryos after 28 days of CUMS

Item	$n^{\triangle}$	Control group	Mild stress group	Moderate stress group	Severe stress group	P
Counts of oocytes	10	33±8	29±6	21±6*	15±4*,#	<0.05
Fertilization rate	20	88%	78%	61%*	38%*,#	<0.05
Counts of 2-cell embryos	20	27±5	22±4	15±4*	8±2*,#	<0.05
Counts of D4 embryos	20	27±4	17±3	10±3*	4±2*,#	<0.05
Counts of high quality embryos	20	20±4	12±4	5±2*	1±1*,#	<0.05
High quality embryo rate	20	85%	74%	50%*	25%*,#	<0.05
Counts of blastocysts	20	8±3	5±2	2±1*	1±1*,#	<0.05
Blastocyst information rate	20	35%	27%	20%	24%	>0.05

△ number of mice. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. moderate stress group



附图 免疫荧光法检测 HSP70 在小鼠 2-细胞胚胎及 D4 胚胎中的表达。×108

Fig Expression of HSP70 in 2-cell embryos and D4 embryos demonstrated by immunofluorescent staining. ×108

A: 2-cell embryo from a stressed mouse; B: 2-cell embryo of a control mouse; C: D4 embryo from a stressed mouse; D: D4 embryo of a control mouse

表 3 HSP70 在小鼠 2-细胞胚胎及 D4 胚胎中的表达

Table 3 Expression of HSP70 in 2-cell and day 4 embryos as measured by immunofluorescence (IF) and RT-PCR

Expression of HSP70	$n^{\triangle}$	Control group	Mild stress group	Moderate stress group	Severe stress group	P
IF/case (%)						
Positive 2-cell embryos	30	3 (10)	26 (87)*,#	18 (60)*	4 (13)	<0.05
Positive D4 embryos	30	6 (20)	25 (83)*,#	14 (47)*	5 (17)	<0.05
RT-PCR						
2-cell embryos	50	1	6±2*	3±1*,#	1.2±1	<0.05
D4 embryos	30	1	13±5*,#	7±3*	1.5±1	<0.05

△ number of embryos, * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. moderate stress group

3 讨论

昆明小鼠是我国特有的封闭群小鼠,具有独特的遗传学性状,是常用的实验动物之一。而在相同强度的心理应激下,昆明小鼠是做出相同或不同程度的应激反应,目前尚无相关报道。本研究的心理刺激包括束缚应激、高温和孤养等 9 种慢性、轻度和不可预见的应激因子,共刺激 28 d。模仿人类焦虑抑郁程度分级,我们根据旷场实验中小鼠的中央格停留时间、跨格次数和竖立次数将应激小鼠分为轻度、中度和重度应激 3 组。结果显示,CUMS 刺激 28 d 后,实验组小鼠出现不同程度的应激反应,轻度应激占 50%,中度应激占 32%,重度应激占 18%,与人类经历应激事件所表达的情绪程度分级

比例类似[13]。

通过对小鼠采用 PMSG/HCG 促排卵治疗，结果发现，轻度应激组小鼠的获卵数、受精率、2-细胞胚胎数、D4 胚胎数、优胚数、优胚率和囊胚数均较对照组无明显差异，而中、重度应激组小鼠则明显降低。此结果一方面证实 CUMS 降低雌性昆明小鼠卵巢对超排卵的反应性和卵母细胞发育潜能，与本课题组前期研究及国外其他类型小鼠研究结果一致[14]；另一方面提示相同应激因子刺激后，轻度应激小鼠的生殖功能以应激保护为主，而中、重度则出现明显的应激损伤。

1962 年 RITOSSA 等[15]首次阐述了果蝇唾液腺染色体对高温的热休克反应，12 年后该特征反应的首个基因产物得以证实并命名为热休克蛋白[16]。HSP70 是热休克蛋白家族中结构最保守、功能最重要、对应激条件最敏感的一员，可以对细胞应激反应起到保护作用。本研究中给予的心理刺激是慢性轻度不可预见性心理应激，通过免疫荧光法和实时荧光定量 PCR 检测 HSP70 在小鼠 2-细胞胚胎和 D4 胚胎中的表达。结果显示，无论是 HSP70 阳性表达率还是 *HSP*70 mRNA 在轻度和中度应激组较对照组明显升高，而在重度应激组和对照组之间则无明显差异。提示 HSP70 在轻、中度应激组小鼠胚胎中的表达升高，可能与其应激保护作用有关。

HSP70 羧基端相互作用蛋白(CHIP)是目前应激领域研究的一大热点，其在应激条件下发挥关键的双分子开关作用[17]。本课题组拟在下一步研究中，以 CUMS 昆明小鼠孕 4 d 胚胎为研究对象，通过电穿孔转染特异性 *CHIP*-siRNA 的方法沉默 *CHIP* 基因，进一步探讨 HSP70 对胚胎应激保护的分子机制。

综上，昆明小鼠可能对 CUMS 刺激做出不同程度的应激反应，HSP70 在轻、中度应激组小鼠胚胎中的表达升高，可能与其应激保护作用有关。

参　考　文　献

[1] PETERSON BD, PIRRITANO M, CHRISTENSEN U, *et al*. The longitudinal impact of partner coping in couples following 5 years of unsuccessful fertility treatments. Hum Reprod, 2009, 24(7): 1656-1664.

[2] LUND R, SEJBAEK CS, CHRISTENSEN U, *et al*. The impact of social relations on the incidence of severe depressive symptoms among infertile women and men. Hum Reprod, 2009, 24(11): 2810-2820.

[3] SYDSJ G, SVANBERG AS, LAMPIC C, *et al*. Relationships in IVF couples 20 years after treatment. Hum Reprod, 2011, 26(7): 1836-1842.

[4] PENG YL, LIU YN, LIU L, *et al*. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. J Neuroinflammation, 2012, 9: 75. doi: 10.1186/1742-2094-9-75.

[5] MA XC, JIANG D, JIANG WH, *et al*. Social isolation-induced aggression potentiates anxiety and depressive-like behavior in male mice subjected to unpredictable chronic mild stress. PLoS One, 2011, 6 (6): e20955[2016-04-20]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3117867/. doi: 10.1371/journal.pone.0020955.

[6] 李小红，李尚为，罗　珊，等. 慢性轻度不可预见性应激雌性昆明小鼠模型在生殖医学领域应用的可行性探讨. 华西医学，2015，30(11)：2071-2075.

[7] 陈　峪，丘　彦. 热休克蛋白在生殖系统中的研究现状. 重庆医学，2009，38(3)：356-359.

[8] NEUER A, SPANDORFER SD, GIRALDO P, *et al*. The role of heat shock proteins in reproduction. Hum Reprod Update, 2000, 6(2): 149-159.

[9] LUFT JC, DIX DJ. Hsp70 expression and function during embryogenesis. Cell Stress Chaperones, 1999, 4(3): 162-170.

[10] BERNARDINI C, FANTINATI P, ZANNONI A, *et al*. Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. Mol Reprod Dev, 2004, 69(3): 303-307.

[11] LI XH, PANG HQ, QIN L, *et al*. HSP70 overexpression may play a protective role in the mouse embryos stimulated by CUMS. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13: 125. doi: 10.1186/s12958-015-0123-z.

[12] PETER RB. A textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction. 2nd ed. Bourn: The Parthenon Publication Group, 1999: 185-201.

[13] LI XH, MA YG, GENG LH, *et al*. Baseline psychological stress and ovarian norepinephrine levels negatively affect the outcome of *in vitro* fertilization. Gynecol Endocrinol, 2011, 27(3): 139-143.

[14] CONSOLI D, FEDOTOVA J, MICALE V, *et al*. Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). Eur J Pharmacol, 2005, 520(1/2/3): 100-107.

[15] RITOSSA FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in drosophila. Cell Mol Life Sci, 1962, 18(12): 571-573.

[16] TISSIERE A, MITCHELL HK, TRACY U. Protein synthesis in salivary galands of Drosophila melanogaster: relation to chromosomal puffs. J Mol Biol, 1974, 84(3): 389-398.

[17] McClellan AJ, Frydman J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. Nat Cell Biol, 2001, 3(2): 51-53.

(2016－10－23 收稿，2017－02－10 修回)

编辑　余　琳